

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



7

<p>(51) 国際特許分類6 G01N 33/573, A61B 5/00, 5/14</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/49559</p> <p>(43) 国際公開日 1998年11月5日(05.11.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/01972</p> <p>(22) 国際出願日 1998年4月30日(30.04.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/113126 1997年4月30日(30.04.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) マルハ株式会社(MARUHA CORPORATION)[JP/JP] 〒100-8608 東京都千代田区大手町一丁目1-2 Tokyo, (JP) 財団法人 大阪バイオサイエンス研究所 (OSAKA BIOSCIENCE INSTITUTE)[JP/JP] 〒565-0874 大阪府吹田市古江台六丁目2-4 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 織田浩司(ODA, Hiroshi)[JP/JP] 佐藤信行(SATO, Nobuyuki)[JP/JP] 西川正純(NISHIKAWA, Masazumi)[JP/JP] 清水興介(SEIKI, Kosuke)[JP/JP] 〒300-4295 茨城県つくば市和台16-2 マルハ株式会社 中央研究所内 Ibaraki, (JP)</p>		<p>裏出良博(URADE, Yoshihiro)[JP/JP] 〒604-8227 京都府京都市中京区西洞院通蛸薬師下ル 古西町440 藤和シティコープ706 Kyoto, (JP)</p> <p>江口 豊(EGUCHI, Yutaka)[JP/JP] 〒525-0045 滋賀県草津市若草七丁目7-13 Shiga, (JP)</p> <p>江口直美(EGUCHI, Naomi)[JP/JP] 〒533-0005 大阪府大阪市東淀川区瑞光一丁目6-9 メゾンU301号 Osaka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105-0001 東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, CA, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書 請求の範囲の補正の期限前の公開; 補正書受領の際には再公開される。</p>
<p>(54)Title: METHOD FOR DETECTING OR PREDICTING ISCHEMIC DISEASES</p> <p>(54)発明の名称 虚血性疾患の検出または予知方法</p> <p>(57) Abstract A method for detecting or predicting ischemic diseases by using as an indication the concentration of human cerebral prostaglandin D synthetase (hPGDS) in bodily fluid samples. In this method, the hPGDS concentration data of bodily fluid samples taken from subjects are compared with the standard range defined by using normal subjects to thereby detect or predict ischemic diseases.</p>		

(57)要約

本発明は、体液試料中のヒト脳型プロスタグランジンD合成酵素（以下、「hP GDS」という。）の濃度を指標とする虚血性疾患の検出または予知方法を提供する。より特定的には、該方法は、被検者から採取した体液試料中の hPGDS 濃度を健常者について設定した基準範囲と比較し虚血性疾患の検出または予測を行う方法である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AM	アルメニア	FR	フランス	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AT	オーストリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SN	セネガル
AU	オーストラリア	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	UA	ウクライナ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	US	米国
CA	カナダ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CG	コンゴ	IL	イスラエル	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CH	スイス	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CI	コートジボアール	IT	イタリア	NO	ノールウェー		
CM	カメルーン	JP	日本	NZ	ニュー・ジーランド		
CN	中国	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
CZ	チェコ	KR	韓国	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		
ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア		

明 細 書

虚血性疾患の検出または予知方法技術分野

本発明は、体液試料中のヒト脳型プロスタグランジンD合成酵素（以下「hPGDS」という。）の濃度を測定し、該濃度を指標として虚血性疾患を検出または予知する方法に関するものである。

背景技術

プロスタグランジンD₂は、アラキドン酸から合成される生理活性物質であり、プロスタグランジンHからPGD合成酵素によって生産される。このhPGDSは近年、ヒト脳脊髄液中に多量に存在することが知られていたβ-トレースと同一であることが明らかにされ、その分布状態からも、中枢系疾患との関連性が期待されていた。また、精液、羊水等にも分布することから、生殖能力の判定（乏精子症の判定）、胎児の発育診断等への利用も考えられてきたが、虚血性疾患との関連を示唆した報告はこれまでにない。

虚血性疾患の主要因となる動脈硬化には比較的太い動脈や大動脈に生じる粥状硬化と末梢細小動脈に見られる細小動脈硬化がある。粥状硬化は泡沫細胞の増生、繊維増殖、脂質沈着による内膜肥厚、血栓形成、石灰化などをきたし、内腔の狭窄や閉塞にいたり、虚血による障害をもたらす。また細小動脈硬化は、内膜に結合繊維が増加し、強い硝子化が起こる。この硝子化は中膜に及ぶことがあり、動脈全体が肥厚硝子化し、内腔が狭小化し、虚血障害をもたらす。一般に動脈硬化の成因に関しては以下のように考えられている。すなわち、高脂血症、高血圧などなんらかの因子により内皮細胞の障害が起こると、血清成分とともに流血中より単球が動脈壁内に侵入しマクロファージとなる。マクロファージは壁内で酸化され変性した酸化低比重リポタンパク質（LDL）を取り込み泡沫細胞となる。刺激された内皮細胞やマクロファージ、粘着血小板からは成長因子や遊走因子が放出され、内膜への平滑筋の遊走、増殖が誘起される。平滑筋も脂肪を蓄積し、膨化する。その後、内膜肥厚、粥腫形成、狭窄、潰瘍形成、癒痕化をきたし、病

巢が完成されていくこととなる。

冠状動脈の硬化により血流障害をきたすものが、狭心症や心筋梗塞となる虚血性心疾患であり、脳動脈では脳硬塞などの脳循環障害が、末梢動脈では閉塞性動脈硬化疾患が出現する。細小動脈硬化は内膜、中膜の硝子化による肥厚、変性をともない、脳、腎障害が顕著である。

いずれの虚血性疾患も初期には全くの無症状で経過し、ある程度病変が進行するまで臨床症状は出現しない。しかし、この間の虚血性疾患の予測に用いる有用な生化学的検出法はいままで開発されていない。症状が出現し、それに伴う臨床検査の異常をきたした時点では病巣はすでに終末像を呈している。現時点では初期病変を的確に反映するスクリーニング法はなく、血清脂質、高血圧、喫煙等々の危険因子の累積評価に依存している。

上記のとおり、虚血性疾患の初期病変を測定できる方法はなく、しかも臨床症状が出現した後においてはきわめて厳しい生活管理や治療が必要であるため、初期病変を的確に反映するスクリーニング法の開発は緊急な課題となっている。

発明の開示

本発明者らは、プロスタグランジンD₂が動脈硬化に伴う基質変化に反する作用—血液凝固抑制作用等—を示すことから、プロスタグランジンD₂を合成するhPGDSと動脈硬化との関係に着目した。上記した課題を解決するために、まず健常者を対象に血液、脳脊髄液、尿などの体液試料中のhPGDS濃度を測定し、それぞれの基準範囲を設定した。そして、体液試料中のhPGDS濃度が虚血性疾患の初期マーカーとなりうるかどうか、すなわち、体液試料中のhPGDS濃度と虚血性疾患の関係を鋭意検討した結果、虚血性疾患患者から採取した体液試料中のhPGDS濃度、或いは、虚血性疾患患者の過去に採取された体液試料中hPGDS濃度が健常者から採取した体液試料中のhPGDS濃度の範囲に比べて有意に差があることを見出した。このように、体液試料中のhPGDSの動態を追跡することにより、これら虚血性疾患の早期予測、検出を可能とするに至った。また、従来の虚血性疾患の危険因子（高血圧、血清脂質、喫煙）の累積評価による予測方法と本発明による予測方法との比較を行うと、従来の方法に比べより早い段階で、かつより高率に予測可能であることが判明した。

すなわち、本発明は体液試料中の hPGDS を測定することを特徴とする虚血性疾患の検出または予知方法である。体液試料としては、血液、尿、脳脊髄液、唾液又は精液が挙げられる。測定法としては、免疫学的測定法が挙げられる。さらに、得られる hPGDS 濃度を健常者についての hPGDS 濃度と比較することにより、虚血性疾患を検出または予知することが好ましい。

虚血性疾患としては、動脈硬化に起因する疾患、塞栓に起因する疾患、心筋梗塞又は狭心症等の虚血性心疾患、脑梗塞、脳内出血、クモ膜下出血又は硬膜下出血等の頭蓋内出血、解離性動脈瘤又は腹部大動脈瘤等の動脈瘤、腎硬化症、又は川崎病の後遺症として出現する心筋梗塞などが挙げられる。

さらに、本発明は、ヒト脳型プロスタグランジンD合成酵素に特異的な抗体を含む虚血性疾患検出用キットを提供する。該キットは、好ましくはヒト脳型プロスタグランジンD合成酵素に特異的な第一及び第二の抗体を含む。この場合には、前記第二の抗体は、好ましくはヒト脳型プロスタグランジンD合成酵素と前記第一の抗体との複合体に結合することができる。さらに、前記第一及び第二の抗体はそれぞれ、モノクローナル抗体であることが好ましい。前記第一の抗体としては、例えば、モノクローナル抗体 7F5（後述）が挙げられ、前記第二の抗体としては、例えば、モノクローナル抗体 1B7（後述）が挙げられる。

図面の簡単な説明

図1は末梢血中における hPGDS 濃度と HDL 濃度との関係を示すグラフである。

図2は左心房心内膜の免疫組織染色像である。

図3は冠状動脈の初期動脈硬化病変の免疫組織染色像である。

図4は健常者と狭心症患者の大心静脈血中 hPGDS 濃度を比較するグラフである。

図5はPTCA施行前の冠状動脈血中と大心静脈血中 hPGDS 濃度を比較するグラフである。

図6は健常者と狭心症患者の末梢血中 hPGDS 濃度を比較するグラフである。

図7は狭心症患者大心静脈血中 hPGDS 濃度のPTCA施行後の経時変化を示すグラフである。

図 8 は健常者と脳梗塞患者の脳脊髄液中 h P G D S 濃度を比較するグラフである。

図 9 は健常者と脳梗塞患者の末梢血中 h P G D S 濃度を比較するグラフである。
発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明を詳細に説明する。

虚血性疾患患者の体液試料中の hPGDS 濃度と疾患の関係を調査すると、虚血性疾患患者の体液試料中の hPGDS 濃度は健常者のそれに比較して変動する傾向が認められる。従って、被検者から体液試料を採取し、hPGDS 濃度を測定すれば、被検者が虚血性疾患を起こすか否かを予測または診断することが可能である。ここで言う体液試料とは、例えば血液、尿、唾液、涙、脳脊髄液、精液、などが挙げられるが特にこれらに限定されるものではない。hPGDS 濃度の測定は、通常の方法に従えばよいが、好ましくは免疫学的測定法 (EIA, ELISA, RIA, FIA 等) を用いる。更に、hPGDS を正確に、かつ簡便に測定することができ、とりわけ臨床検査の場において多数の生体試料を同時処理することのできる実用性の観点から、酵素免疫測定法又は放射免疫測定法が最も好ましい。すなわち、hPGDS に対して特異的に反応性を有するポリクローナル抗体或いはモノクローナル抗体を調製し、酵素免疫測定法もしくは放射免疫測定法により、hPGDS を直接的に定性的及び／又は定量的に検出する方法が実際上可能である。このような測定法としては、体液試料中 hPGDS 量を測定するという目的が達成されさえすればいずれの方法でもよく、特に限定されるものではない。

本発明の好ましい態様では、hPGDS の検出方法としては、2 抗体サンドイッチ ELISA 法を用いる。2 抗体サンドイッチ ELISA 法で使用する 2 つの抗体は、それぞれ別々のエピトープを認識する抗 hPGDS モノクローナル抗体を用いることが好ましい。これら 2 つの抗体の一方 (第一の抗体) は何らかの担体、例えばマイクロタイタープレートに固相化し、hPGDS を固定化するために使用することができる。他方の抗体 (第二の抗体) は、固定化された hPGDS に結合させることができる抗体であればよく、この抗体は、その後の検出のための検出可能な物質で標識しておくことが好ましい。検出可能な標識物質としては、ビオチンを挙げることができる。ビオチンを検出する方法としては公知の方法を用いることができるが、

好ましくはストレプトアビジンとペルオキシダーゼとのコンジュゲートをビオチンに結合させる方法を用いる。このようなペルオキシダーゼとしては、西洋ワサビペルオキシダーゼが挙げられる。さらに、ペルオキシダーゼの検出には、そのペルオキシダーゼの作用によって発色する物質を用いることが好ましい。

なお、上述の2つの抗体はいずれも、当業者であれば適宜作製することができるため、特に限定しないが、好ましくは、細胞株 1B7 の産生するモノクローナル抗体 1B7 及び細胞株 7F5 の産生するモノクローナル抗体 7F5 を使用することができる。これらの細胞株は、1B7 についてはFERM BP-5709 (原寄託日：平成7年9月21日)として、7F5 についてはFERM BP-5711 (原寄託日：平成8年6月6日)として工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)に寄託されている。これらの細胞株から、それぞれ対応するモノクローナル抗体を作成する方法としては、当業者に公知の方法を用いることができる。上記の抗体を使用する場合には、好ましくは、7F5 を第一の抗体として使用し、1B7 を第二の抗体として使用することができる。

以上に示す物質を用いて hPGDS を検出するためには、まず、マイクロタイタープレートなどの担体に固相化した第一の抗体に hPGDS を結合させる。次いで、固定化された hPGDS に、ビオチンで標識した第二の抗体を結合させた後に、ビオチン部分にストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲートを結合させる。最後に、西洋ワサビペルオキシダーゼの作用によって発色する物質を添加して発色させ、これを定量する。発色物質として TM-Blue (INTERGEN) を使用する場合には、停止液として 0.5N 硫酸を加えて攪拌した後に、プレートリーダー等を用いて 450 nm における吸光度を測定することにより、定量することができる。

この様にして得られた値を健常者について設定した基準範囲と比較する。この基準範囲は体液試料の種類によって異なるため、被検者について測定しようとする体液試料の基準範囲を設定しておく必要がある。基準範囲は、数人の健常者から採取した体液試料に含まれる hPGDS 濃度を測定し、その測定値に基づいて基準範囲を設定することができる。hPGDS 濃度の測定は、上述の方法に従って行うことができる。測定値からの基準範囲の設定は、当業者であれば適切に設定するこ

とができるが、好ましくは測定値の平均値±標準偏差とする。このようにして設定した基準範囲と、被検者の体液試料における hPGDS 濃度の測定値とを比較する方法としては、当業者に公知の方法を用いることができるが、好ましくは上記基準範囲に基づいて決定した基準値と比較方法を用いる。この場合には、被検者についての測定値が基準値よりも高ければ、その被検者は虚血性疾患に罹患する又は罹患している可能性が高いと判断することができる。このような基準値としては、好ましくは（平均値 + 2 × 標準偏差）を用いる。

本発明により心筋梗塞、狭心症、脳梗塞、脳出血、クモ膜下出血、硬膜下出血、解離性動脈瘤、腹部大動脈瘤、腎硬化症等の虚血性疾患の検出または予後管理、あるいはこれら疾患にかかる可能性の高い者を予知することが可能となる。虚血性疾患の検出又は虚血性疾患に罹患する可能性の高い者の予知は、上述の方法によって行うことができる。予後管理は、例えば、虚血性疾患の治療を行った後に、被検者から採取した体液試料中の hPGDS 濃度をモニタリングすることによって行うことができる。

さらに、本発明は、本発明の方法を実施するために使用できる虚血性疾患検出用のキットを提供する。該キットは、hPGDS に特異的な抗体を含み、これにより、免疫学的測定法による虚血性疾患の検出を行なうことができる。免疫学的測定法として 2 抗体サンドイッチ ELISA 法を用いる場合には、該キットは、hPGDS に特異的な第一及び第二の抗体を含むことができる。第二の抗体は、好ましくは、hPGDS と第一の抗体との複合体に結合することができる。この目的を達成するためには、例えば、認識するエピトープが第一の抗体の認識するものと異なる抗体を第二の抗体として用いるとよい。また、第一の抗体及び第二の抗体はそれぞれ、モノクローナル抗体であることが好ましい。このような第一の抗体としては、例えば、モノクローナル抗体 7F5 が挙げられ、第二の抗体としては、例えば、モノクローナル抗体 1B7 が挙げられる。

本発明のキットはさらに、抗体の固相化、抗体の検出等に用いることのできる物質及び／又は器具を含んでもよい。抗体の固相化のためには、マイクロタイタープレートなどの担体、炭酸緩衝液などの固相化用液体、ゼラチン含有 PBS などのブロッキング液等を含むことができる。抗体の検出のためには、抗体を予め標

識しておくことが好ましく、その場合には、該キットはその検出用試薬を含むことができる。例えば、標識物質としてビオチンを使用する場合には、検出用試薬としてストレプトアビジンと西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) のコンジュゲート、並びに HRP の作用によって発色する発色液を含むことができる。また、必要であれば、説明書などを含んでもよい。

以下、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明する。但し、これら実施例によって本発明の技術的範囲を限定するものではない。

実施例 1

健常者の末梢血、大心静脈血、脳脊髄液中の hPGDS 濃度測定と各サンプルにおける基準範囲の設定。

健常者から上記体液試料を採取し、末梢血、大心静脈血、脳脊髄液中の hPGDS 濃度測定と各サンプルにおける基準範囲の設定を行った。末梢血は 12 例、大心静脈は 6 例、また脳脊髄液は 8 例採取し、以下の方法に従って hPGDS 濃度を測定した。hPGDS 濃度の測定は 2 抗体サンドイッチ ELISA 法によって行った。すなわち、始めに、hPGDS と結合可能な抗 hPGDS モノクローナル抗体 (クローン: 7F5) を 50mM 炭酸緩衝液 (pH 9.6) に 4.4 $\mu\text{g/ml}$ になるように溶解し、96 ウエルマイクロタイタープレートに 300 μl /ウエルずつ加えて、4°C で一晩放置し固相化した。次にこのプレートをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS: pH 7.4) で 3 回洗浄した後、0.2%ゼラチンを含む PBS (ブロッキング液; pH 7.4) を 300 μl /ウエル加えて 30°C で 90 分インキュベートした。標準 hPGDS 溶液は、脳脊髄液 (以下 CSF という。) から精製した hPGDS をブロッキング液で段階希釈したものを用い、標準曲線を作成した。前記のようにして調製したブロッキング後のプレートを 0.05%Tween20 を含む PBS (T-PBS) で 3 回洗浄した後、100 μl の上記標準液あるいはブロッキング液で適宜希釈したサンプルを各ウエルに加え、30°C で 90 分間インキュベートした。上記のように抗原を反応させたプレートを T-PBS で 3 回洗浄した後、ブロッキング液で希釈したビオチン標識化抗 PGDS モノクローナル抗体 (クローン: 1B7) 100 μl を各ウエルに加え、30°C で 90 分間インキュベートした。ビオチン標識化抗 hPGDS モノクローナル抗体は hPGDS と結合可能で、固相化モノクローナル抗体 7F5 とは異なるエピトープを認識する抗 hPGDS モノクローナ

ル抗体 1B7 をビオチン化したものを用いた。このプレートを洗浄後、ブロッキング液で希釈したストレプトアビジン HRP (西洋ワサビペルオキシダーゼ) コンジュゲート (Biosource, Cat. : 6467) 100 μ l を各ウエルに加え、30°C で 90 分間インキュベートした。T-PBS で 3 回洗浄した後、発色液 (TM-Blue : INTERGEN) 100 μ l を各ウエルに加え、30°C で 20 分間インキュベートした後、停止液 (0.5N 硫酸) を 100 μ l ずつウエルに加え、プレートミキサーで攪拌して反応を停止させた。市販のプレートリーダー (生化学工業社製 : 型番 Sk601) により 450 nm の吸光度を測定した。

以上の方法において使用した 2 種のモノクローナル抗体 1B7 及び 7F5 を産生するハイブリドーマは、WO 97/16461 に記載されている通り、hPGDS で免疫した動物から得られる抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合によって作製した。

尚、上記モノクローナル抗体を産生する細胞株はそれぞれ上記モノクローナル抗体名に一致し、それぞれの細胞株は、工業技術院生命工学工業技術研究所 (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号) に、1B7 については FERM BP-5709 (原寄託日平成 7 年 9 月 21 日)、7F5 については FERM BP-5711 (原寄託日平成 8 年 6 月 6 日) として寄託されている。また、モノクローナル抗体の製造は以下のようにして行った。まず、マウス腹腔内にプリスタン 1.0 ml を注射し、その後 2 週間目に上記細胞株 1B7、7F5 を 1×10^8 個マウスの腹腔内に移植し、2 週間後に腹水を採取した。得られた腹水をプロテイン A アフィニティーカラムクロマトグラフィーによって分画し、上記モノクローナル抗体を 3 ~ 10mg/ml 得た。

測定の結果、健常者によって得られた基準値範囲は、末梢血では $0.373 \pm 0.024 \mu\text{g/ml}$ 、大心静脈では $0.424 \pm 0.034 \mu\text{g/ml}$ 、脳脊髄液では $11.61 \pm 3.08 \mu\text{g/ml}$ であった (平均値 \pm 標準偏差、以下同様)。

実施例 2

健常者の末梢血 hPGDS 濃度と各種血液生化学項目との関連

健常者から末梢血を採取し、hPGDS 濃度の測定を行った。末梢血は 230 例採取し、実施例 1 と同様の方法によって血中 hPGDS 濃度を測定した。さらに、総コレステロール (T-CHO)、高比重リポタンパク質 (HDL)、低比重リポタ

ンパク質 (LDL)、トリグリセリド (TG) および尿酸の濃度も同時に、常法によって測定した。

その結果、末梢血に関して、動脈硬化のリスクファクターの判定に用いられる血中HDL値と血中hPGDS濃度との間に負の相関があることが明らかとなった (図1)。血中HDL以外の値と血中hPGDS濃度との間には、特に相関は見られなかった。

実施例 3

免疫組織染色

hPGDS と結合可能な抗 hPGDS モノクローナル抗体を用いた免疫組織染色によって心臓各組織における hPGDS 分布を検討した。

標本作製の手順は以下の通りである。固定は4%パラホルムアルデヒド液 (10%シュクロース液含、pH 7.5) にて後固定を行い (4℃、3~4時間) さらにこの組成の固定液に pH3.5~4.0 となるよう酢酸を添加 (5%程度) した固定液に4℃で5時間から一昼夜放置する。標本作製は通常のパラフィン標本作製法に準じ、厚さ6~10 μ mの切片を作製する。続いて通常の脱パラフィン処理を行い、その後ブロッキング処理までに2ステップの処理を必要とする。即ち、はじめに、0.3%過酸化水素含有のメタノール溶液に室温にてプレートを30分浸漬し、続いて、0.3%ペプシン0.01N酢酸溶液に室温にて5分間浸漬する。その後10%Normal Sheep Serum Tris Buffer Seline, 0.05% Triton X 100 にて室温で1時間ブロッキングを行った後、1次抗体を反応させ、続いてビオチン化した2次抗体を反応させる。発色にはHistofine PAP キット (ニチレイ社製) を用い、3', 3'-ジアミノベンチジンと過酸化水素で発色させる。核染色は1%クレジルバイオレット30%エタノール溶液にて行い、その後脱水、キシレン封入を経て観察に供した。

図2に示すように、hPGDSは左心房の心内膜の細胞に陽性で、形態学的に内皮細胞であると考えられた。また、冠状動脈においても一部の内皮細胞に一致してhPGDS陽性所見が認められた。このことから、hPGDSは内皮細胞において産生されていることが明らかとなった。さらに図3に示すように冠状動脈の内膜内の初期粥状動脈硬化病変 (合成型平滑筋のコロニー) 周辺にhPGDSの陽性所見が認め

られた。

このことから、hPGDS は動脈硬化の初期病変に密接に関連していることが明らかとなった。

実施例 4

狭心症と血中 hPGDS 濃度変動との関連性の検討

狭心症患者の経皮経管的冠血管形成術（Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty、以下「PTCA」と略す。）前の血液を採取し、その血中 hPGDS 量を測定することにより動脈硬化に伴う狭心症と血中 hPGDS 濃度との関係を検討した。

狭心症患者 5 例から PTCA 施行前に末梢血、大心静脈血を採取した。また、PTCA 施行後経時的に大心静脈より採血を行い、血液を遠心分離しサンプルとした。血中 hPGDS 濃度の測定は実施例 1 の方法に従った。

結果を図 4、5、6、7 に示す。狭心症患者の大心静脈血中 hPGDS 濃度は $0.691 \pm 0.109 \mu\text{g/ml}$ で健常者の大心静脈血中 hPGDS 濃度 $0.424 \pm 0.017 \mu\text{g/ml}$ に対して有意に高いこと、また PTCA 施行前の大心静脈血中 hPGDS 濃度 ($0.691 \pm 0.109 \mu\text{g/ml}$) が冠状動脈血中 hPGDS 濃度 $0.537 \pm 0.144 \mu\text{g/ml}$ より有意に高いことから、冠状動脈血管の動脈硬化により反応的に hPGDS の産生量が増加していることが明らかとなった。

また、狭心症患者の末梢血中 hPGDS 濃度も $0.480 \pm 0.098 \mu\text{g/ml}$ で、健常者の末梢血中 hPGDS 濃度 $0.373 \pm 0.024 \mu\text{g/ml}$ と比較すると有意に差が認められ、心臓血管での現象が末梢レベルで反映されている。このことから、末梢血中 hPGDS 濃度の健常者の値との比較により、狭心症の検出が可能であることが明らかとなった。

PTCA 施行後の経時的な大心静脈血中 hPGDS 濃度は時間とともに低下しており、回復段階では、健常者の大心静脈血中レベルまで低下していた。このことから、本発明により狭心症の PTCA 施行後の予後管理が可能であることが判明した。

実施例 5

血中脂質値と血中 hPGDS 値の狭心症患者における比較

内頸動脈壁エコー所見、上肢、下肢の血圧差、負荷心電図、血小板凝集能、眼

底検査から動脈硬化が進行していると考えられた狭心症患者 3 例、健常者 3 例の末梢血中脂質及び末梢血中 hPGDS 値を測定し、動脈硬化との関連性を比較検討した。尚、血中脂質については動脈硬化の危険因子である高比重リポタンパク質（以下 HDL という。）及び低比重リポタンパク質（以下 LDL という。）を、常法によって測定した。一般に HDL と LDL で動脈硬化の危険性が高いと判断されるのは、HDL が低値、LDL が高値を示す場合とされていることから、各々、40mg/dl 以下、150mg/dl 以上を危険性判定の基準値とした。また、血中 hPGDS 濃度の測定は実施例 1 の方法に準じて行い、hPGDS 濃度による動脈硬化の判定基準は $0.373 + 0.048$ （平均値 + $2 \times$ 標準偏差） $\mu\text{g/ml}$ 以上とした。結果を表 1 に示す。

表 1

狭心症診断用データとしての血中脂質値と血中 hPGDS 値の比較

	hPGDS 濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)
健常者 1	0.40	42	112
健常者 2	0.35	61	105
健常者 3	0.33	50	145
狭心症患者 1	1.10*	29*	201*
狭心症患者 2	0.93*	43	120
狭心症患者 3	0.78*	49	222*
基準値	0.426 以上	40 以下	150 以上

危険性が推測される値には*を付した。

健常者 3 例の hPGDS 値はいずれの測定値も正常であった。狭心症患者は 3 例中 3 例が血中 PGDS 濃度の基準値を超えており、一方血中 HDL 濃度は 3 例中 1 例が正常範囲基準値 40mg/dl を下回っていた。また血中 LDL は 3 例中 2 例（1 例は低 HDL 値を示す患者とは別人）が基準値 150mg/dl を超えていた。この結

果より、血中 PGDS 濃度は従来の危険因子である血中 HDL、LDL 濃度よりも動脈硬化という病態をより反映しており、動脈硬化の予測に有用であることがわかった。

実施例 6

脳梗塞と脳脊髄液中 hPGDS 濃度との関連性の検討

脳梗塞患者の脳脊髄液を採取しその脳脊髄液中の hPGDS 量を測定することにより動脈硬化に伴う脳梗塞と血中 hPGDS 濃度との関係を検討した。

脳梗塞患者 5 例から脳脊髄液を採取し、実施例 1 と同様の方法で hPGDS 濃度を測定した。結果を図 8 に示す。このように脳梗塞患者の脳脊髄液中 hPGDS 濃度は $27.308 \pm 3.52 \mu\text{g/ml}$ で健常者のそれと有意に差のあることが判明した。このことから、脳脊髄液中 hPGDS 濃度の健常者の値との比較により、脳梗塞の検出が可能であることが明らかとなった。

実施例 7

脳梗塞と血中 hPGDS 濃度との関連性の検討

脳梗塞患者の末梢血を採取し、その末梢血中の hPGDS 量を測定することにより動脈硬化に伴う脳梗塞と血中 hPGDS 濃度との関係を検討した。

脳梗塞患者 5 例から末梢血を採取し、実施例 1 と同様の方法で hPGDS 濃度を測定した。結果を図 9 に示す。このように脳梗塞患者の末梢血 hPGDS 濃度は $0.716 \pm 0.258 \mu\text{g/ml}$ で健常者の値 ($0.373 \pm 0.024 \mu\text{g/ml}$) と有意に差があることが判明した。このことから、末梢血中 hPGDS 濃度の健常者との比較により、脳梗塞の検出が可能であることが明らかとなった。

実施例 8

虚血性疾患の予測

動脈硬化の初期病変と血中 hPGDS 濃度の因果関係を明らかにするために、また、従来の予測方法である、危険因子の累積評価と比較するために、動脈硬化にともなう虚血性疾患を負った患者 7 例で、診断が下される以前に採取し保存していた血液を測定し、本発明によって予測される陽性率と、従来の方法によって予測される陽性率について比較検討を行った。累積評価には、常法によって測定した T-CHO、HDL、LDL、TG、血糖、尿酸、喫煙の有無の 7 因子に定め、

各々 220mg/dl 以上、40mg/dl 以下、150mg/dl 以上、150mg/dl 以上、140mg/dl 以上、7.5mg/dl 以上、20 本/ 日以上で喫煙歴 10 年以上を危険性の判断基準とし、総合的に判断した。また、本発明では、実施例 1 の方法に準じて患者の血清を測定し、血中濃度が $0.373 + 0.048$ (平均値 + $2 \times$ 標準偏差) $\mu\text{g/ml}$ 以上を判断基準とした。

結果を表 2、3 に示す。

表 2

血中 hPGDS 濃度による虚血性疾患の予測

	被検者 1	被検者 2	被検者 3	被検者 4	被検者 5	被検者 6	被検者 7
hPGDS 濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	1.13*	0.72*	0.56*	0.98*	1.31*	0.40	0.69*
判定	+	+	+	+	+	-	+

基準値 : $0.426 \mu\text{g/ml}$ 以上。基準値を超える値には*を付した。

表 3

T-CHO、 HDL、 LDL、 TG、 血糖、 尿酸、 喫煙の有無の

累積評価による虚血性疾患の予測

	被検者 1	被検者 2	被検者 3	被検者 4	被検者 5	被検者 6	被検者 7
T-CHO	200	275*	190	263*	287*	220*	253*
HDL	51	29*	58	24*	43	59	35*
LDL	123	222*	150*	205*	211*	120	—
TG	142	157*	40	162*	155*	56	82
血糖	100	94	88	111	184*	126	96
尿酸	5	5.5	6.2	7.8*	6.1	6.3	6.0
喫煙	有*	有*	有*	無	無	有*	無
判定	—	+	—	+	+	—	+

基準値 ; T-CHO : 220 以上、 HDL : 40 以下、 LDL : 150 以上、 TG : 150 以上、

血糖 : 140 以上、 尿酸 : 7.5 以上、 喫煙 : 有。

基準値を超える値には*を付した。

これによると、従来法では、7 例中 4 例で危険率が高いと判定されたのに対し、本発明による予測では 7 例中 6 例の予測が可能であった。このことから、本発明は、従来の方法に比べて高率に虚血性疾患を予測することが可能であることが判明した。。

産業上の利用の可能性

本発明の方法により、虚血性疾患の検出及び予知を簡便かつ高率に行うことができる。

請求の範囲

1. 体液試料中のヒト脳型プロスタグランジンD合成酵素の濃度を指標とする虚血性疾患の検出または予知方法。
2. 体液試料中のヒト脳型プロスタグランジンD合成酵素の濃度が免疫学的測定法により測定されたものである、請求項1に記載の方法。
3. 体液試料中のヒト脳型プロスタグランジンD合成酵素の濃度を、健常者の体液試料中のヒト脳型プロスタグランジンD合成酵素の濃度と比較することを特徴とする、請求項1又は2に記載の方法。
4. 体液試料が血液、尿、脳脊髄液、唾液又は精液である請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。
5. 虚血性疾患が動脈硬化に起因する疾患である請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。
6. 虚血性疾患が塞栓に起因する疾患である請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。
7. 虚血性疾患が虚血性心疾患である請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。
8. 虚血性心疾患が心筋梗塞又は狭心症である請求項7に記載の方法。
9. 虚血性疾患が脳梗塞である請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。
10. 虚血性疾患が頭蓋内出血である請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。
11. 頭蓋内出血が脳内出血、クモ膜下出血又は硬膜下出血である請求項10に記載の方法。
12. 虚血性疾患が動脈瘤である請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。
13. 動脈瘤が解離性動脈瘤又は腹部大動脈瘤である請求項12に記載の方法。
14. 虚血性疾患が腎硬化症である請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。
15. 虚血性疾患が川崎病の後遺症として出現する心筋梗塞である請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。
16. ヒト脳型プロスタグランジンD合成酵素に特異的な抗体を含む虚血性疾患検出用キット。
17. ヒト脳型プロスタグランジンD合成酵素に特異的な第一及び第二の抗体を

含む、請求項 16 記載の虚血性疾患検出用キット。

18. 前記第二の抗体が、ヒト脳型プロスタグランジンD合成酵素と前記第一の抗体との複合体に結合することができる、請求項 17 記載の虚血性疾患検出用キット。
19. 前記第一及び第二の抗体の一方又は両方がモノクローナル抗体である請求項 17 又は 18 に記載の虚血性疾患検出用キット。

図 1

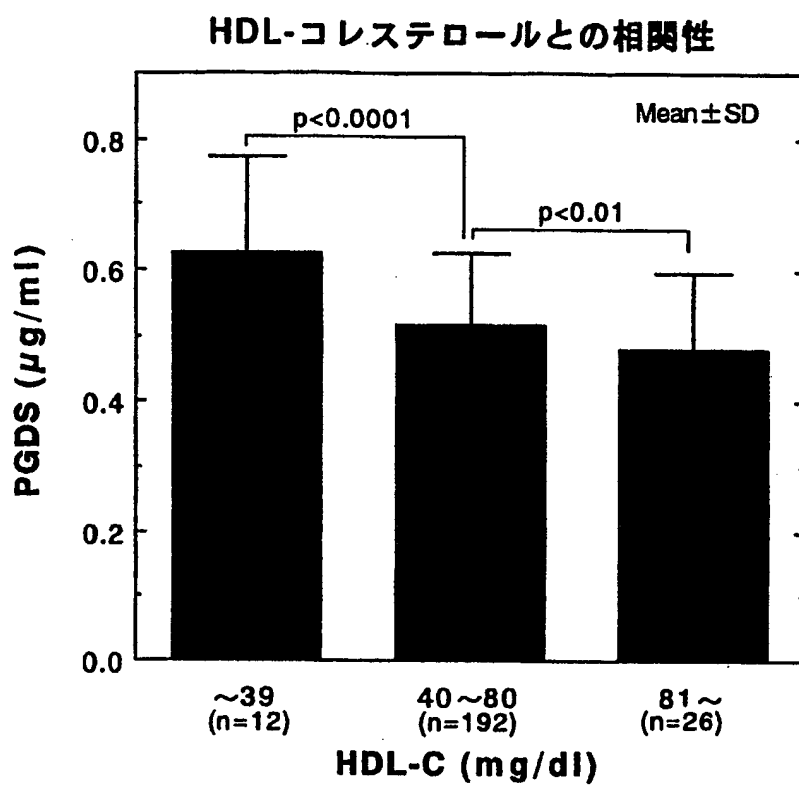


図 2



図 3

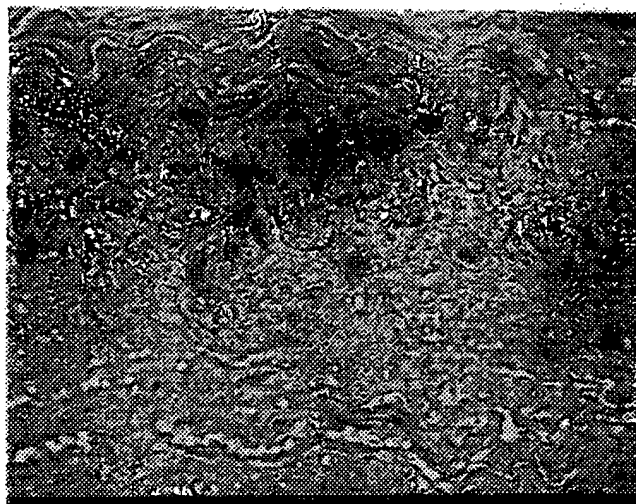
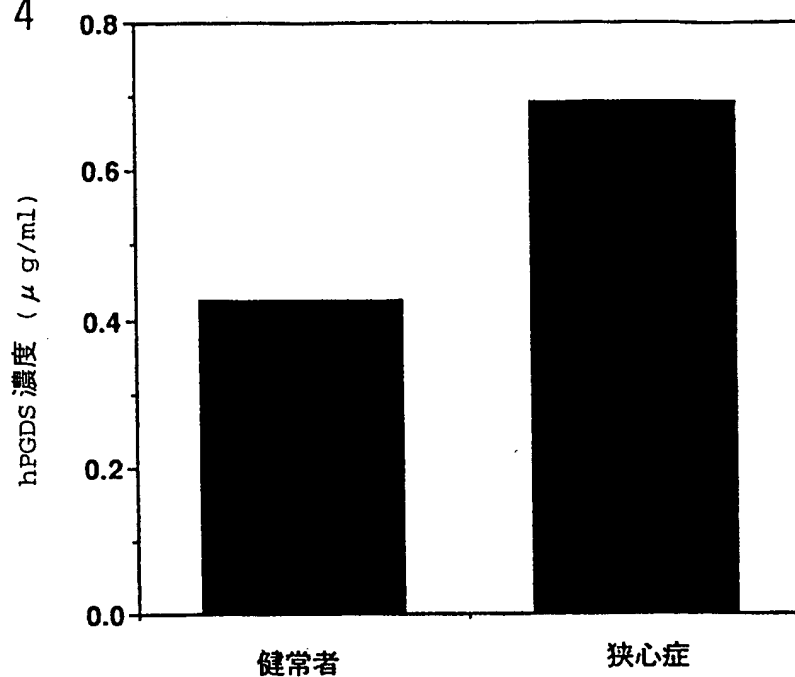


図 4



健康者と狭心症患者の最大静脈血中hPGDS濃度の比較

図 5

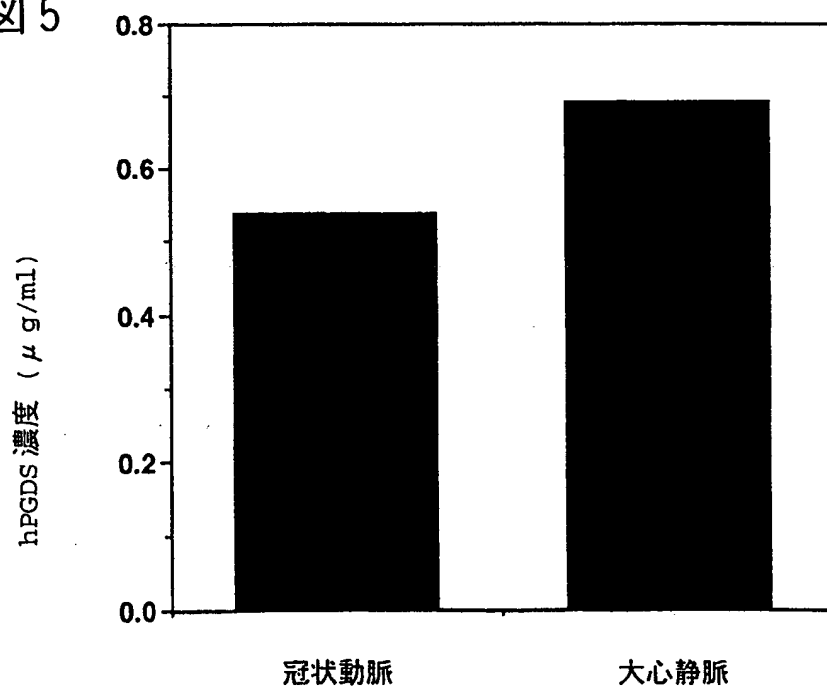
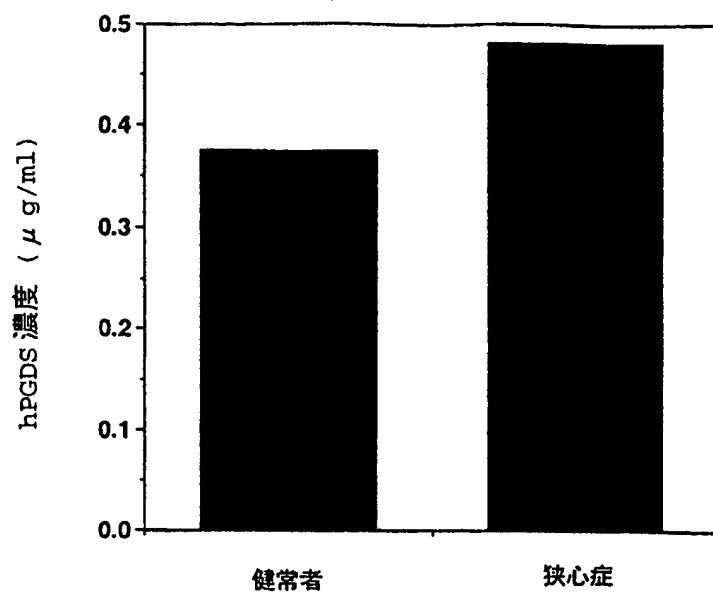
PTCA施行前の冠動脈血中と最大静脈血中
hPGDS濃度の比較

図 6



健康者と狭心症患者の末梢血中hPGDS濃度の比較

図 7

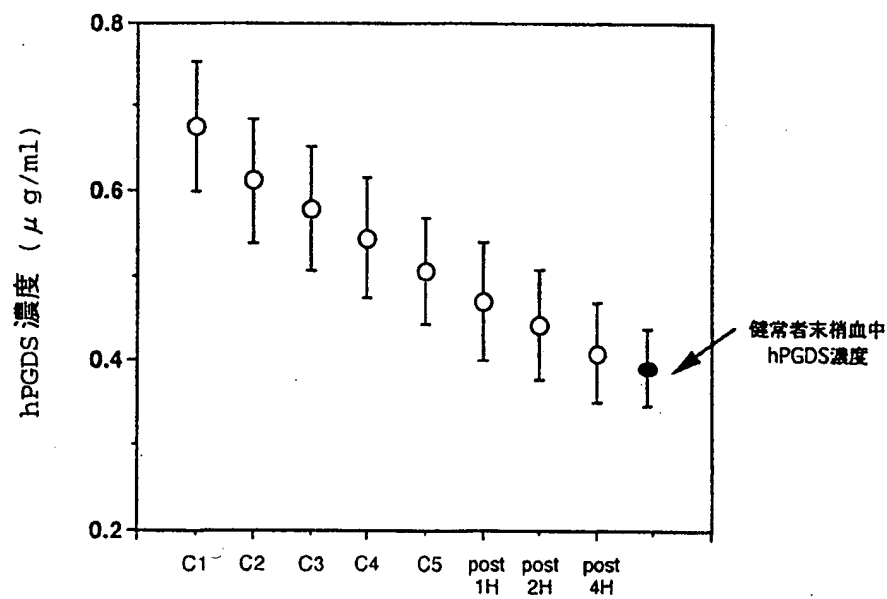
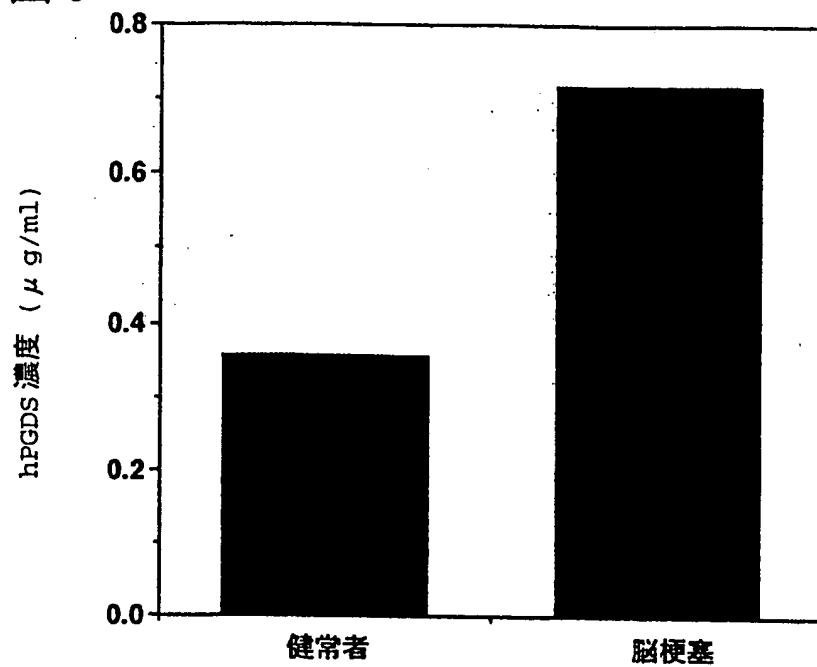
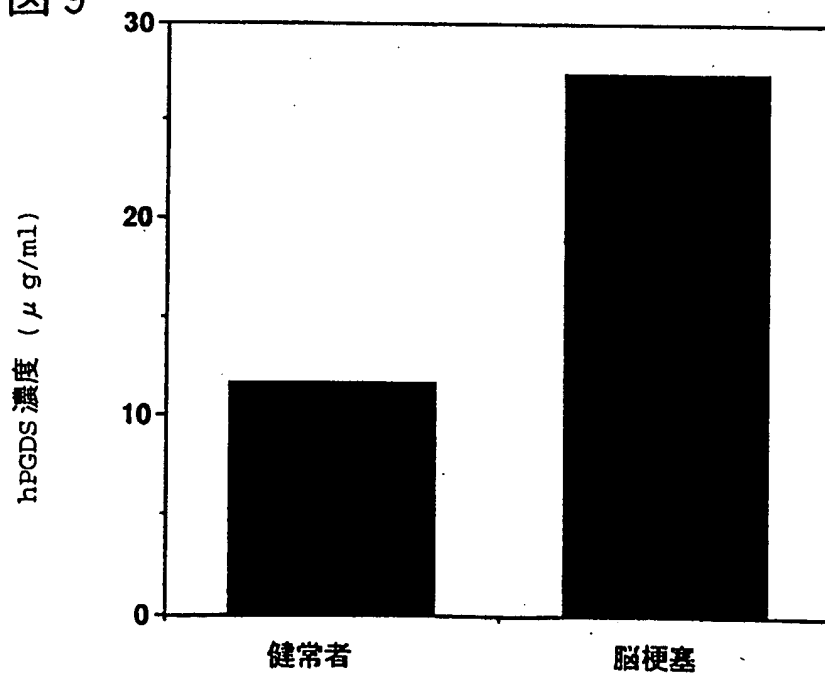
狭心症患者大心静脈血中hPGDS濃度の
PTCA施行後の経時変化

図 8



健常者と脳梗塞患者の脳脊髄液中hPGDS濃度の比較

図 9



健常者と脳梗塞患者の末梢血中hPGDS濃度の比較

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/01972

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.C1 ⁶ G01N33/573, A61B5/00, A61B5/14		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.C1 ⁶ G01N33/573, A61B5/00, A61B5/14		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1972-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1998 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1998 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-1998		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BAIOSIS PREVIEWS JOIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	"BRAIN-TYPE PROSTAGLANDIN D SYNTHETASE OCCURS IN THE RAT COCHLEA", PROC NATL ACAD SCI USA 84(21), 1987, p.7677-7680	1-19
PA	"Expression of lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) in human heart and its accumulation in the coronary circulation of angia patients", PROC NATL ACAD SCI USA, 94(26), 1997, p.14689-14694	1-19
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 July, 1998 (28. 07. 98)		Date of mailing of the international search report 8 September, 1998 (08. 09. 98)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 98/01972

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ G01N33/573, A61B5/00, A61B5/14

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ G01N33/573, A61B5/00, A61B5/14

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1972-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-1998年

日本国登録実用新案公報 1994-1998年

日本国実用新案登録公報 1996-1998年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BAIOSIS PREVIEWS

JOIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	"BRAIN-TYPE PROSTAGLANDIN D SYNTHETASE OCCURS IN THE RAT COC HLEA", PROC NATL ACAD SCI USA 84(21), 1987, P. 7677-7680	1-19
PA	"Expression of lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) in human heart and its accumulation in the coronary circulation of angia patients", PROC NATL ACAD SCI USA, 94(26), 1997, P. 14689-14694	1-19

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリ

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28.07.98

国際調査報告の発送日

08.09.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

黒田浩一

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

2 J

9507

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.